

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-234641

(43)Date of publication of application : 23.08.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/505
A61K 31/47
A61K 31/55
A61K 31/70
// C07D411/04
(A61K 31/505
A61K 31:70)
(A61K 31/505
A61K 31:47)

(21)Application number : 04-148384

(71)Applicant : GLAXO GROUP LTD

(22)Date of filing : 15.05.1992

(72)Inventor : CAMERON JANET M
CAMMACK NICHOLAS

(30)Priority

Priority number : 91 9110624

Priority date : 16.05.1991

Priority country : GB

91 9121381

08.10.1991

91 9123581

06.11.1991

GB

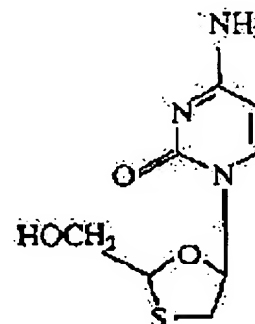
GB

(54) ANTIVIRAL COMBINATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a prescribed agent which consists of a combination of a specific 1,3-oxathiolanenucleoside analogue and another HIV replication inhibitor and has a synergistic viral effect and reduced cytotoxicity.

CONSTITUTION: This prescribed agent consists of a composition contg. a compound represented by the formula or its pharmaceutically-acceptable derivative (preferably, (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolane-5-yl)-1H-pyrimidine-2-one that is a (-) enantiomer, or its salt) and an HIV replication inhibitor (preferably, 3'-azido-3'-deoxythymidine or 2',3'-dioxynosine), together with a pharmaceutically-acceptable carrier for them. The enantiomer of the compound represented by the formula has remarkably lower cytotoxicity as compared with the (+) enantiomer and such a compound consists essentially of the (-) enantiomer and contains substantially no (+) enantiomer (≤ 1 wt.%) is preferably used.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

07.12.1995

[Date of sending the examiner's decision of

* NOTICES *

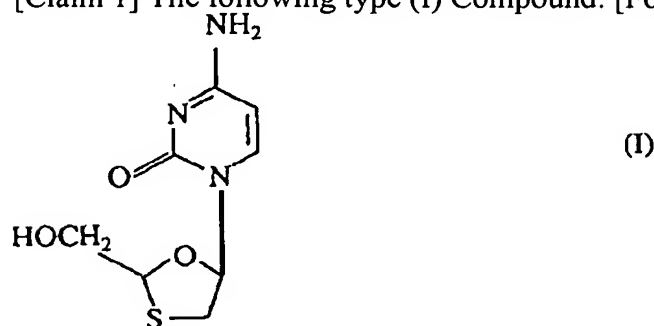
JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The following type (I) Compound: [Formula 1]



Or consist of a derivative permitted on the pharmaceutical sciences, and an inhibitor of a HIV duplicate, and put together.

[Claim 2] Formula (I) Combination according to claim 1 whose compound is the salt permitted on -(2R, cis)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-1H-pyrimidine-2-ON (3TC) or its pharmaceutical sciences.

[Claim 3] Combination according to claim 2 in which 3TCs do not contain on parenchyma the correspondence (+) enantiomer of the compound indicated by claim 1.

[Claim 4] A publication should combine with any 1 term of claims 1-3 whose inhibitor of a HIV duplicate is an inhibitor of HIV reverse transcriptase.

[Claim 5] An inhibitor A 3'-azide-3'-deoxythymidine (AZT), 2', 3'-dideoxyinosine (ddI), N'- [-- 1(S)-benzyl-3-[4a (S) and 8a (S) -- 3 (S) - 5 A deca hydronalium isoquinoline-2-IRU]-2(R)-hydroxypropyl]-N''-(quinoline-2-IRUKARUBA moi)-L-asparagine amide (Ro 31-8959) and (+)-S-4, 6, (tert-butylcarbamoyl) Are chosen from the derivative permitted on 7-tetrahydro-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl) imidazo [4, 5, 1-jk] [1, 4] benzodiazepine-2(1H)-thione (R-82913, TIBO) or those pharmaceutical sciences. A publication should combine with any 1 term of claims 1-4.

[Claim 6] (2R, cis-) Consist of a derivative permitted on the derivative permitted on -4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-1H-pyrimidine-2-ON (3TC) or its pharmaceutical sciences and a 3'-azide-3'-deoxythymidine, or its pharmaceutical sciences, and put together.

[Claim 7] Formula (I) A publication should combine with any 1 term of claims 1-6 whose ratios of the inhibitor of a compound pair HIV duplicate are 250:1-1:250 by weight.

[Claim 8] Formula indicated by claim 1 (I) Physic formula agent which contains the derivative permitted on a compound or its pharmaceutical sciences, and the inhibitor of a HIV duplicate together with the carrier permitted on the pharmaceutical sciences for these.

[Claim 9] Formula which is the therapy approach of the mammalian except Homo sapiens which it started or is easy to suffer from HIV infection, and was indicated by claim 1 (I) How to consist of carrying out coincidence administration of the derivative permitted on a compound or its pharmaceutical sciences, and the inhibitor of a HIV duplicate.

[Claim 10] Formula (I) Approach according to claim 9 by which coincidence is medicated with a compound and the inhibitor of a HIV duplicate.

[Claim 11] Formula (I) Approach according to claim 9 by which a target is serially medicated with a compound and the inhibitor of a HIV duplicate.

[Claim 12] Formula (I) Approach given in any 1 term of claims 9-11 whose compound is -(2R, cis)-4-

amino-1-(2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-1H-pyrimidine-2-ON (3TC).

[Claim 13] An approach given in any 1 term of claims 9-12 as which the inhibitor of a HIV duplicate is chosen from a 3'-azide-3'-deoxythymidine and 2', and 3'-deoxyinosine.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

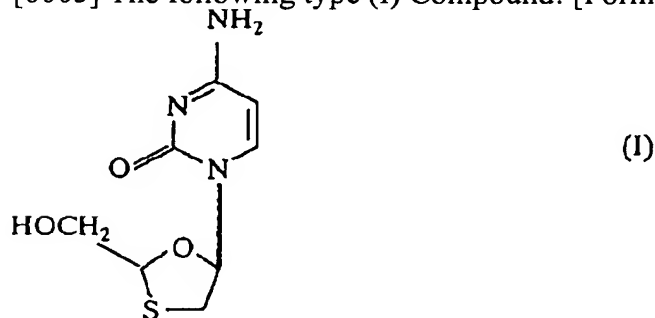
[0001] This invention relates to the combination of an antiviral. Furthermore, this invention relates to combination with effective ** in detail to 1 and 3-OKISACHIO run nucleoside analog, other antiviral, especially HIV.

[0002] A human immunodeficiency virus (HIV) causes various clinical manifestations including acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and chronic neuropathy. Seemingly a nucleoside like AZT, ddC, and ddI will check a HIV duplicate by in vitro one, and it will demonstrate those antiviral activity with virus code reverse transcriptase, after being metabolized to those 5'-triphosphoric acid derivatives by the cell. AZT decreases morbidity and the death rate in an acquired immunodeficiency syndrome patient. However, HIV infection of a cell needed to continue an AZT therapy for a viral genome over a long period of time for a nest and this reason in the host chromosome. It is accompanied by the appearance of bone marrow toxicity and the AZT resistance variant of HIV-1 as a result of an AZT therapy over a long period of time. Similarly some acquired immunodeficiency syndrome patients treated by ddC produced the peripheral neuropathy, and it was shown that ddI guides pancreatitis and a peripheral neuropathy.

[0003] The combination use of equipment of a compound produces the increment in drug effect, when the equivalent antiviral effectiveness is produced in low toxicity or the synergism between compounds arises. Probably the frequency of occurrence of the drug tolerance variant of HIV will also decrease, so that an overall drug dosage falls. It was used in order to examine the combination effect of the compound which acts together by the assay system from which the approach a large number differ differs. All these approaches had the limit, for example, some approaches were applied to the system of an except, when they were drawn. AZT shows multiplication antiviral activity by in vitro one, when it combines with ** which acts at HIV-1 duplicate steps other than reverse transcription including recombination fusibility CD4 KASUTANO spermine and recombination interferon-alpha. However, the combination of a compound must be noticed about making cytotoxicity increase and getting. AZT and recombination interferon-alpha have the high cytotoxic effectiveness by the normal Homo sapiens bone marrow progenitor cell.

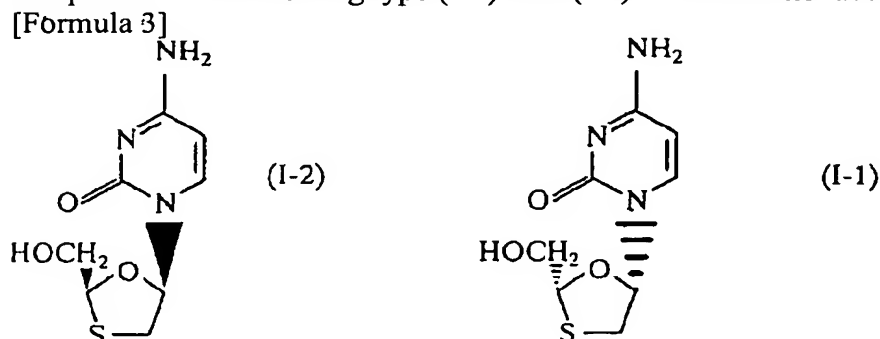
[0004] The combination of AZT and other nucleosides was also studied. ddC -- a high dose -- the bone marrow cell toxicity of AZT is removed, without influencing the antiviral activity. ddI and AZT show a little high selectivity in combination, and the multiplication antiviral effectiveness is acting to a normal Homo sapiens bone marrow progenitor cell beyond additive toxicity.

[0005] The following type (I) Compound: [Formula 2]



It was known also as ** BCH-189 or NGPB-21, and it was indicated that it had antiviral activity to the human immunodeficiency virus (HIV) which is especially the cause object of an acquired immunodeficiency syndrome (5th Anti-Aids Conference, Montreal, Canada 5th-9th June 1989: Abstracts T.C.O.1 and M.C.P.63; the Europe patent application public presentation No. 382562 specification). formula (I) a

compound -- the following type (I-1) And (I-2) : which is the racemic mixture of a two-sort enantiomer --



[0006] formula (I) the enantiomer of a compound -- HIV -- receiving -- etc. -- although it is effect, one enantiomer ((-) enantiomer) has low cytotoxicity more remarkable than the (+) enantiomer. The (-) enantiomer has a chemical name called (-) cis--4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-1H-pyrimidine-2-ON. It is a formula (I-1) with a name called -(2R, cis-)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-1H-pyrimidine-2-ON. It has the absolute stereochemistry of a compound. This compound is known as current 3TC.

[0007] We are formulas (I). It discovered that a compound and an advantage unexpected when the (-) enantiomer is especially used combining the well-known inhibitor of a HIV duplicate were shown here. It is especially a formula (I). A compound shows the multiplication antiviral effectiveness and/or a cytotoxic reduction, when used combining the well-known inhibitor of a HIV duplicate.

[0008] For this reason, it sets to the first page of this invention, and is a formula (I). The combination which consists of a derivative permitted on a compound or its pharmaceutical sciences and an inhibitor of a HIV duplicate is offered. An inhibitor may be what kind of HIV duplicate inhibitor irrespective of the HIV duplicate inhibition approach. As such an inhibitor, there are some which check HIV reverse transcriptase, a HIV protease, TAT, etc., for example. As such an inhibitor, for example A 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT, zidovudine), 2', 3'-dideoxycytidine (ddC), 2', 3'-dideoxyinosine (ddI), N'- [-- 1(S)-benzyl-3-[4a (S) and 8a (S) -- 3 (S) - 5 A deca hydronalium isoquinoline-2-IRU]-2(R)-hydroxypropyl]-N''-(quinoline-2-IRUKARUBA moi)-L-asparagine amide (Ro 31-8959) and (+)-S-4, 6, (tert-butylcarbamoyl) There is a derivative permitted on 7-tetrahydro-5-methyl-6-(3-methyl-2-butenyl) imidazo [4, 5, 1-jk] [1, 4] benzodiazepine-2(1H)-thione (R-82150, TIBO) or those pharmaceutical sciences.

[0009] Preferably, it is a formula (I). A compound is the form of the (-) enantiomer (3TC). Preferably, the inhibitor of a HIV duplicate is chosen from AZT, ddI, Ro 31-8959, or R-82150 (TIBO). ddI -- or AZT is desirable especially especially as an inhibitor of a HIV duplicate. Formula (I) When a compound is the form of the (-) enantiomer, it is offered, without usually including a correspondence (+) enantiomer on parenchyma, namely, it is about 5%w/w. It is about 2%w/w preferably hereafter. The following, especially about 1%w/w The following (+) enantiomers only exist.

[0010] with "the derivative permitted on pharmaceutical sciences", activity metabolite or residue can be formed on a parent compound or antiviral by administration to the salt or acceptor of the salt permitted on all the pharmaceutical sciences of a parent compound, ester, or such ester (direct -- or -- indirectly) -- all -- others -- a compound is meant. Formula (I) Probably, it will be clear for this contractor that you may change so that the derivative with which a compound is permitted on the pharmaceutical sciences by the functional group in the both sides of the hydroxymethyl group of a base part and an OKISA thio run ring may be formed. The correction in such all functional groups is included within the limits of this invention. However, especially the derivative permitted on the pharmaceutical sciences acquired by correction of 2-hydroxymethyl group of an OKISA thio run ring is interesting.

[0011] Formula (I) As desirable ester of a compound, it is hydrogen of 2-hydroxymethyl group.

がアシル官能基 R - C - [そのエステル非カルボニル部分 R は水素、直鎖又は

branched chain alkyl (for example, methyl, ethyl, n-propyl, and t-butyl --) n-butyl, alkoxy alkyl (for example, methoxymethyl), an aralkyl (for example, benzyl), aryloxy alkyl (for example, phenoxymethyl) and aryl (for example, a halogen --) C 1-4 Alkyl or C 1-4 By] chosen from the phenyl permuted by the case

by ARUKOKISHI A sulfonate like permuted compound; alkyl - or an aralkyl sulfonyl (for example, methane sulfonyl); amino acid ester (for example, L-valyl or L-isoleucyl) and 1, and a branch have triphosphoric acid ester. About the above-mentioned ester, as long as there is no indication in others, any existing alkyl parts have the carbon atoms 1-16, especially the carbon atoms 1-4 advantageously. As for any aryl parts which exist in such ester, it is advantageous to have a phenyl group. Especially ester is C1-16 alkyl ester, unsubstituted benzyl ester or at least one halogen (a bromine, chlorine, a fluorine, or iodine), and C 1-6. Alkyl and C 1-6 It is benzyl ester permuted by alkoxy ** nitroglycerine or the trifluoromethyl radical.

[0012] Formula (I) There is a salt guided from inorganic, organic acid, and base which are permitted on pharmaceutical sciences as a salt permitted on the pharmaceutical sciences of a compound. As an example of a suitable acid, there are a hydrochloric acid, a hydrobromic acid, a sulfuric acid, a nitric acid, perchloric acid, a fumaric acid, a maleic acid, a phosphoric acid, a glycolic acid, a lactic acid, a salicylic acid, a succinic acid, a toluene-p-sulfonic acid, a tartaric acid, an acetic acid, a citric acid, methansulfonic acid, a formic acid, a benzoic acid, a malonic acid, a naphthalene-2-sulfonic acid, and benzenesulfonic acid. Although other acids like oxalic acid are not permitted on pharmaceutical sciences in itself, when obtaining the acid addition salt permitted on the compounds of this invention, and those pharmaceutical sciences, they are useful as intermediate field. As a salt guided from a suitable base, they are alkali metal (for example, sodium), alkaline earth metal (for example, magnesium), ammonium, and NR_4^+ . There is a salt (R is C 1-4 it is alkyl).

[0013] Formula (I) Except for [it is multiplication-like / a compound / as the second component of combination, and/or] the cytotoxic effectiveness of the second component. formula (I) the advantageous effectiveness of a compound and the second antiviral -- 1:250-250:1 -- desirable -- 1:50-50:1 -- it realizes covering the large ratio of about 1:10-10:1 especially. [for example,] Conveniently, each compound is combined and used in the amount which shows antiviral activity, when it is used independently.

[0014] This combination is expected to be usually useful to the virus infection or the virus related neoplasm in Homo sapiens, and those direction for use for checking virus infection or tumor growth by in vitro one or in vivo one also belongs within the limits of this invention. For this reason, it sets to the second page and is a formula (I). The therapy approach of the virus infection in mammalian including the Homo sapiens who consists of coincidence administration of an antiviral compound and the inhibitor of a HIV duplicate is offered. Together or formula in either of many involution combination (I) The therapy approach which consists of combination administration of a compound and two or more sorts of second antivirals also belongs within the limits of this invention. Formula (I) Probably, a compound and the second antiviral of prescribe [a medicine / for the patient / coincidence and / by any of successive or combination] will be clear. The time delay which prescribes the second active ingredient for the patient seems not to lose the profits of the synergistic effect of combination, when administration is successive. Preferably, administration is simultaneous. Probably, it will be clear for this contractor to also attain to the established infection, or not only the therapy of a symptom but prevention, when mentioning a therapy here.

[0015] Probably, it will be still clearer not only the concrete compound chosen but that the amount's of this invention required for a therapy of combination change according to age and symptom of the property of a route of administration and the symptom treated and a patient, and discretion of a doctor in charge or a veterinarian is finally entrusted. however -- general -- a suitable dosage -- each active ingredient of a combination agent -- being related -- about 1 - about 750 mg/kg The range, 3 [for example,], - about 120 mg/kg About 10 like acceptor weight / day - about 75 mg/kg weight/day -- desirable -- the range of 6 - 90 mg/kg / day -- it is the range of 15 - 60 mg/kg / day most preferably. a desirable dosage -- a single dosage -- or -- for example, it is convenient to be given by the divided dosage which is prescribed for the patient at suitable spacing like 2, 3, 4, or the amount of application with necessary modifications / day beyond it. the convenience of that 20-1000mg is conveniently prescribed for the patient with the unit dosage forms containing 50-700mg 10-1500mg of each active ingredient per for example, unit dosage forms of a combination agent is good. ideal -- a combination agent -- each activity compound about 1- about 75 mMs, preferably, a medicine should be prescribed for the patient about two to 50 mM so that the peak plasma concentration of about three to about 30 mM(s) may be reached most preferably. This is administered orally as bolus which was attained in salt water by the case by the intravenous injection of 0.1 - 5% solution of an active ingredient, or contained each active ingredient 1 [about] - 100mg of abbreviation. the continuous intravenous drip infusion which desirable blood level gives each active ingredient 0.01 [about] - about 5.0 mg/kg/hr -- or about 0.4 - about 15 mg/kg It is maintained by contained intermittence impregnation.

[0016] the object for a therapy -- the active ingredient of a combination agent -- a compound -- although it is

possible for a medicine to be prescribed for the patient as remaining as it is, it is desirable to offer a combination agent as a physic formula agent. For this reason, this invention is a formula (I). The physic formula agent which contains the derivative permitted on a compound or its pharmaceutical sciences and the inhibitor of a HIV duplicate together with other therapies and/or a prevention component by the carrier permitted on the pharmaceutical sciences for [one or more sorts of] these and the case is offered further. A carrier suits with other components of a formula, and "can be permitted" for the purpose of not being harmful to the acceptor. There is a form where it was suitable for taking orally, the form or inhalation which passed and was suitable for the rectum, pernasality, a part (an oral cavity and the hypoglottis are included), vaginal, or parenteral (inside of intramuscular, hypodermically, and vein is included) administration, or administration by aeration as a physic formula agent. As long as the formula agent is suitable, being provided in a separate medication unit is convenient, and it may manufacture it by what kind of well-known approach in the dispensing industry. By all approaches, an activity compound is mixed with a liquid carrier, a pulverizing solid-state carrier, or both sides, and if it is the need after an appropriate time, the step which fabricates a product to a desirable formula is included.

[0017] It is [the physic formula agent suitable for internal use] convenient to be provided as; solution, suspension, or an emulsion as; powder or granulation as a separate unit like the capsule by which each contained the active ingredient of the amount of conventions, cachets, or a tablet. An active ingredient may be offered as bolus, confections, or a paste. The tablet and capsule for internal use may also contain an idiomatic excipient like a binder, a filler, lubricant, disintegrator, or a moisturizer. According to the well-known approach, the coat of the tablet may be carried out in this industry. Even if oral liquid pharmaceutical preparation is the form of aquosity or oily suspension, a solution, an emulsion, syrup, or an elixir, it may be offered as desiccation pharmaceutical preparation prepared with water or other suitable vehicles before use. Such liquid pharmaceutical preparation may contain an idiomatic additive like a suspending agent, an emulsifier, a nonaqueous nature vehicle (edible oil is also included), or a preservative.

[0018] The compound by this invention may be prescribed to parenteral administration (for example, based on bolus injection or injection like continuous intravenous drip infusion), and may be offered in a unit dosage form into the ampul with which the preservative was added, a pre-restoration syringe, few capacity impregnation, or a busy amount container. A constituent may take a form like suspension, a solution, or an emulsion in oiliness or an aquosity vehicle, and may also contain suspension, a stabilizer, and/or a formula agent like a dispersant. On the other hand, an active ingredient may be the powder form acquired by sterile isolation of a sterilization solid-state object or freeze drying from a solution, in order to prepare with a vehicle suitable before use, for example, sterile non-pyrogen water.

[0019] In partial administration on epidermis, the compound by this invention may be prescribed as an endermic patch as ointment, a cream, or a lotion. Ointment and a cream are prescribed with aquosity or an oily basis, for example by addition of a suitable thickener and/or a gelling agent. A lotion is prescribed by aquosity or the oily basis, and, generally also contains one or more sorts of an emulsifier, a stabilizer, dispersants, suspending agents, thickeners, or coloring agents.

[0020] Pastel which contains an active ingredient in a deactivating group agent like the lozenge; gelatin which usually contains an active ingredient in a sucrose and gum arabic, or an aroma basis like a tragacanth gum and a glycerol or a sucrose, and gum arabic as a formula agent suitable for opening internal division place administration; there is mouth rinsing liquid which contains an active ingredient in a suitable liquid carrier. The physic formula agent whose carrier is a solid-state and which passed and was suitable for rectum administration is most preferably offered as unit dosage suppositories. There is other matter regularly used in cacao butter and this industry as a suitable carrier, and it is [suppositories] convenient to be formed by cooling and shaping within a mold after an appropriate time [with an activity compound, softening, or a melting carrier / mixing].

[0021] The formula agent suitable for vagina administration may be offered as the pessary which contained a carrier which is well-known in this industry as suitable in addition to the active ingredient, a tampon, a cream, gel, a paste, form, or a spray.

[0022] In the administration in a nose, the compound of this invention may be used in the form of drops as a liquid spray or dustability powder. Drops are prescribed by aquosity or the nonaqueous nature basis also including one more sort of dispersants, a solubilizing agent, or a suspending agent. Being emitted from a pressurization pack is [a liquid spray] convenient.

[0023] In administration by inhalation, it is [the compound by this invention] convenient to be emitted from other idiomatic means to emit an aeration machine, a nebulizer, a pressurization pack, or an aerosol spray. A pressurization pack contains a dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, the

dichlorotetrafluoroethane, a carbon dioxide, or suitable propellants like other suitable gas. In the case of pressurization aerosol, a medication unit is determined by having the bulb which emits the amount of measurement. On the other hand, in administration by inhalation or aeration, the compound by this invention is very good in the form of the powder mix with a desiccation powder constituent, for example, this compound, a lactose, or a suitable powder basis like starch. A powder constituent may be offered with the unit dosage forms of a blister pack with which a capsule like gelatin, a cartridge, or powder is prescribed for the patient with the help of an inhaler or an aeration machine.

[0024] If it is a request, said formula agent which suited so that an active ingredient might be made sustained-release will be used. The physic constituent by this invention may also contain other active ingredients or preservatives like an antimicrobial agent. Formula (I) A compound is obtained as indicated by the Europe patent application public presentation No. 382562 specification. Each enantiomer of the is obtained from the racemic modification by division by one of well-known approaches in this industry about separation of racemic modification to those configuration enantiomers. Especially they are obtained from well-known racemic modification by the alternative zymolysis of the suitable derivative using the enzyme medium enantiomer selectivity catabolism by Chiral HPLC and suitable enzyme like cytidine deaminase, or a 5'-nucleotide. The manufacture approach of 3TCs is indicated by the international patent application public presentation WO 91st/the No. 17159 specification.

[0025] Although the following example shows this invention, it is not interpreted as the limit. intermediate-product 15-methoxy-1 and 3-OKISA -- the solution of thio run-2-methanol benzoate heat methanol (15ml) Nakashio-ized zinc (1.6g) was added to the stirring solution of the mercapto acetaldehyde dimethyl acetal (34.2g) in toluene (1300ml), and a benzoyloxy acetaldehyde (48.3g), and heating reflux was carried out for 50 minutes under nitrogen after an appropriate time. The cooled mixed liquor was condensed, and it diluted with slight toluene, and filtered with porosity diatomaceous earth after an appropriate time. An aqueosity saturation sodium-hydrogencarbonate solution (x2) and salt water wash the filtrate and toluene which were doubled. (MgSO₄) Dry, and it is made to evaporate to oily matter after an appropriate time, and is a silica (2kg) about this. Give a Merck 9385 upper column chromatography and elution is carried out under chloroform. The title product (45.1g) was obtained as mixture (about 1:1) of an anomer by oily matter.; ¹H NMR 3.1-3.3 (4H) (DMSO-d₆), 3.42 (6H), 4.4-4.6 (4H), 5.41 (1H), 5.46 (1H), 5.54 (1H), 5.63 (1H), 7.46 (4H) and 7.58 (2H), 8.07(4H);gammamax(CHBr₃)1717.6cm⁻¹[0026] The heating reflux of the mixed liquor of intermediate-product 2(**)-cis--1-(2-benzoyl oxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-(1H)-pyrimidine-2, 4-dione pulverizing uracil (9.62g), hexamethyldisilazane (50ml), and an ammonium sulfate (30mg) was carried out under nitrogen until the transparent solution was obtained. Cooled this, it was made to evaporate to colorless oily matter after an appropriate time, and this was dissolved in the acetonitrile (100ml) under nitrogen-gas-atmosphere mind. The solution was added to the stirring ice-cooling solution of a 5-methoxy-1 and 3-OKISA thio run-2-methanol benzoate (intermediate product 1) (19.43g) among the acetonitrile (600ml), and trimethylsilyl torr fluoro methanesulfonate (14.7ml) was added. The ice bath was removed and the heating reflux of the solution was carried out for 45 minutes under nitrogen. After cooling and evaporation, elution of the residue was carried out with chloroform / methanol 9:1 with the 1kg silica gel (Merck 9385) upper column chromatography, and it was refined. It cools, suitable fractionation was evaporated and crude residue was obtained. This was fractional-crystallization-ized from the minimum heat methanol (about 1200ml), and the title compound (6.32g) was obtained as a white crystal.; ¹H NMR11.36 (1H, bs) (DMSO-d₆), 7.50-8.00 (6H, m), 6.20 (1H, t), 5.46 (2H, m), 4.62 (2H, m) and 3.48 (1H, m), 3.25 (1H, m). [0027] intermediate-product 3(**)-cis--4-amino-1- (2-benzoyl oxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU) -- the suspension of the cytosine (20.705g) in the -(1H)-pyrimidine-2-ON (approach a) hexamethyldisilazane (110ml) and an ammonium sulfate (several mg) was stirred and heating flowed back over 2.5 hours under nitrogen Evaporation removed the solvent and the residual solid-state object was dissolved in the desiccation acetonitrile (350ml). This solution was moved to the stirring ice-cooling solution of a 5-methoxy-1 and 3-OKISA thio run-2-methanol benzoate (intermediate field 1) (43.57g) with the elasticity needle technique among the acetonitrile (650ml) under nitrogen. Trimethylsilyl torr fluoro methanesulfonate (33ml) was added, the solution was warmed to environmental temperature (1.5 hours), and overnight heating reflux was carried out after an appropriate time. Residual mixture was condensed, it diluted with the saturated water nature sodium-hydrogencarbonate solution (500ml), and ethyl acetate (3x500ml) extracted after an appropriate time. Water (2x250ml) and salt water (250ml) wash the doubled extract, it dries (MgSO₄), and even the foamy object was evaporated after an appropriate time, this was given to the silica (600g, Merck 7734) upper column chromatography, elution was carried out with ethyl-acetate-methanol mixed liquor, and the mixture (about 1:1, 31.59g) of an anomer was obtained. Crystallize

mixture from water (45ml) and ethanol (9.0ml), and a solid-state object (10.23g) is obtained. This is recrystallized from ethanol (120ml) and water (30ml). λ_{max} (MeOH) 229.4nm(E1cm 1% 610); 272.4nm(E1cm 1% 293); which obtained the title product (9.26g) as a white solid-state object ^1H NMR (DMSO- d_6) 3.14 (1H) -- 3.50 (1H), 4.07 (2H), 5.52 (1H), 5.66 (1H), 6.28 (1H), 7.22 (2H), 7.56 (2H), 7.72 (2H), 8.10(2H). [0028] Approach (b) phosphorus oxychloride (7.0ml) was dropped at the stirring ice-cooling suspension of 4-triazole (11.65g) among [1 and 2] the acetonitrile (120ml), internal temperature was kept at 15 degrees C or less after an appropriate time, and triethylamine (22.7ml) was dropped. The solution of (**) -cis--1-(2-benzoyl oxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)-(1H)-pyrimidine-2 and 4-dione (intermediate field 2) (6.27g) was slowly added among the after [10 minutes] acetonitrile (330ml). Subsequently, one night of stirring was continued at the room temperature. Mixed liquor was cooled by the ice bath and water (21ml) was added slowly after an appropriate time [triethylamine (30ml)]. The obtained solution was evaporated and residue was distributed to a saturation sodium-hydrogencarbonate solution (400ml) and chloroform (3x200ml). The set chloroform-extraction liquid was dried with magnesium sulfate, it filtered, and it was made to evaporate and crude residue (9.7g) was obtained. Residue was dissolved in 1,4-dioxane (240ml), and dark aquosity ammonia liquor (specific gravity of 0.880 or 50ml) was added. The solution was evaporated 1.5 hours after and residue was dissolved in the methanol. This was filtered out although this settled the solid-state object. The silica gel (Merck 9385 and 600g) upper column chromatography refined the mother liquor. Suitable fractionation is pooled, and was evaporated and the light-yellowish-brown-color solid-state object (2.18g) was obtained for the same title compound as the case where it is obtained by the approach (a).

[0029] Intermediate field 4 (**) - cis--4-amino-1- Among a -(1H)-pyrimidine-2-on-methanol (250ml) (cis-), -4-amino-1-(2-benzoyl oxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU)- (2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU) (1H) The suspension of - pyrimidine-2-ON (intermediate product 3) (8.19g) and Amberlite (Amberlite) IRA-400 (OH) resin (8.24g) was stirred and heating flowed back over 1.25 hours. The solid-state object was filtered out and the methanol washed after an appropriate time. The set filtrate was evaporated. Residue was ground with ethyl acetate (80ml). The obtained white solid-state object was separated and the title product (5.09g) was obtained.; ^1H NMR (DMSO- d_6) 3.04 (1H), 3.40 (1H), 3.73 (2H), 5.18 (1H), 5.29 (1H), 5.73 (1H), 6.21 (1H), and 7.19 (2H), 7.81(1H). [0030] example 1(-)-cis--4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1, 3-OKISA thio run-5-IRU) -(1H)-pyrimidine-2-(ON i) nutrition broth [oxo--- the id -- each Escherichia coli (ATCC23848) scratched from the nutrition agar plate inoculated annularly three 50ml flasks of shrine (Oxoid Ltd)]. Overnight incubation was carried out at 37 degrees C, shaking a flask by 250 rotations / min, and CDD culture-medium [3 g/l glutamic-acid; 0.2 g/l MgSO_4 ; 2.5 g/l K_2SO_4 ; 2.3 g/l NaCl ; 1.1 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.6 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1.2 g/l cytidine] 4L in 7L fermentation tub was inoculated using each flask after an appropriate time. The culture was fermented by 750 rotations / min at 37 degrees C under aeration with 4 L/min. Cells were collected by centrifugal (for 5000g and 30 minutes) after 24-hour growth, and the wet weight of 72g was obtained. The cell pellet was re-suspended in 300ml (pH7.5) of 20mM tris HCl buffer solutions, and it destroyed ultrasonically (for 4x45 seconds). Centrifugal (for 30,000g and 30 minutes) removed cell debris, and the protein in a supernatant was made to sediment by addition of an ammonium sulfate to saturation 75%. Sediment was collected by centrifugal (for 30,000g and 30 minutes), and the pellet was re-suspended in 25ml (100 mM, pH7.0) of ammonium-sulfate (75% saturation) content HEPES buffer solutions. It is 12,000rpm about an enzyme solution. It obtained by centrifugal [for 30 minutes]. The supernatant was thrown away and the pellet was dissolved in the tris HCl buffer solution (pH7.0, 100mM) to original capacity.

[0031] (ii) It dissolved in water (100ml) and intermediate field 4 (115mg) were stirred. The enzyme solution (0.5ml) was added and mixed liquor was maintained by fixed pH by continuous addition of HCl (25mM). It acted as the monitor of the conversion by Chiral HPLC, and it was shown that the substrate of the (+) enantiomer was deaminated preferentially. The substrate (RT12.5min) of the (+) enantiomer was removed completely 22 hours after, and the solution was adjusted to pH10.5 by addition of a dark sodium hydroxide. Elution of the solution obtained above was carried out in the column [A25; Pharmacia (Pharmacia); 30X1.6cm] of the QAE sephadex equilibrated by pH11 the front. The column was washed by HCl (0.1M) after an appropriate time [water (200ml)]. Fractionation (40ml) was analyzed by drawing and Opposition HPLC. The fractionation 5-13 of substrate content of an unreacted(-) enantiomer was doubled, and it adjusted to pH7.5 by HCl. The fractionation 47 of deamination metaplasia product content was adjusted to pH7.5 by rare NaOH. Analysis by Chiral HPLC showed that it was the mixture (e. e about 90%) with which this matter consists of an enantiomer (RT8.5min) of another side as one enantiomer (RT10.2min) and accessory constituent as a principal component.

[0032] (iii) It was large-scale and said phase (ii) was repeated. It incubated with the enzyme solution (0.5ml) prepared like [in the case of a phase (i)] in the compound (363mg) of Example 1 in 250ml of water. Furthermore, some (0.5ml) enzymes were added 18 and 47 hours after. Reaction mixed liquor was stirred for 70 hours, and was left after an appropriate time for further 64 hours. By analysis by Chiral HPLC, since it showed that the substrate of the (+) enantiomer was deaminated completely, the obtained solution was adjusted to pH10.5 by NaOH. The above-mentioned solution was put on this QAE column, and carried out elution like [in the case of a phase (i)]. The fractionation 2-6 containing the mixture of a residual substrate and a deamination metaplasia product was doubled. The residual substrate ((-) enantiomer) content fractionation 7-13 was doubled, and it adjusted to pH7.5. The deamination metaplasia product content fractionation 25-26 was doubled, and it neutralized. Re-elution of the above-mentioned fractionation 2-6 was carried out in this QAE column. The fractionation 3-11 from this second column contained the unreacted substrate ((-) enantiomer). Fractionation 70 contained the deamination metaplasia product. (iv) The substrate fractionation divided from phase (ii) Reaching (iii) was doubled, and it adjusted to pH7.5. Elution of this solution was carried out in the column (40x2.4cm) of XAD-16 filled up with water. The column was rinsed and elution was carried out with after an appropriate time acetone:water (1:4 v/v). The fractionation of desirable (-) enantiomer content was doubled, it freeze-dried, and white powder (190mg) was obtained.

[0033] The :1. opposition analysis HPLC column whose HPLC method used above was as follows: It is capital cartridge (Capital Cartridge) SUFE resolve (Spherisorb) ODS-2 (5microM).

150x4.6mm eluate: -- +5% (50mM) MeCN rate-of-flow [of ammonium dihydrogenphosphate]: -- 1.5 ml/min detection: -- UV270nm holding-time: -- BCH189 5.5min:deamination BCH189 8.1min2. chiral analysis HPLC column: -- 250x4.6mm (Cyclobond I Acetyl) eluate [of cyclo bond I acetyls]: -- 0.2% triethylammonium acetate (pH7.2)

rate-of-flow: -- 1.0 ml/min detection: -- UV270nm holding-time: -- BCH189 11.0 and 12.5min:deamination BCH189 8.5 and 10.2min (living body conversion was pursued by acting as the monitor of the are recording of a product by loss and 10.2min of a peak by 12.5min)

[0034] In 96 well micro titration plate, serial dilution of example 23.1 independent one or the antiviral activity compound of combination was carried out every 2 times first. checker board titration prepared 25ml part from each compound diluent independent or by mixing in both combination (the inside of new 96 well micro titration plate -- the last capacity of 50ml). Some MT-4 cells (106 cells / ml) were infected by HIV-one-share RF in the 2×10^{-3} infection dosage / cell in the RPMI1640 growth medium. After making a virus adsorb for 90 minutes at a room temperature, the cell was washed in the RPMI1640 growth medium, a non-adsorbed virus was removed, and it re-suspended in 106 cells / ml in RPMI1640 growth medium. The well of content of 50ml of infection cell suspension of only a compound or a growth medium was inoculated. 50ml of pseudo-infection cell suspension was inoculated into the non-compound content well. Subsequently, the plate was incubated for seven days at 37 degrees C among 5%CO₂/air. After incubation and 7.5mg/ml 3-(4, 5-dimethyl thiazole-2-IRU)-2 and 5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) 10ml was added to all wells, and the plate was incubated for 90 more minutes at 37 degrees C. Subsequently, it is 10% (v/v) among isopropanol. Triton X-100 150ml was added and the cell was made to re-suspend. The room temperature analyzed the plate by 405nm in Multi-scan MC (Multiskan MC) [FURO Laboratories (Flow Laboratories), Irvine, and UK] reader after 15 minutes. The conversion to the formazan derivative from yellow MTT is max in a non-infected unsettled cell, and does not exist in an unsettled infected cell.

[0035] The dose-response curve was plotted about the back titration of each compound under the fixed concentration of a secondary compound, concerning each compound independent (IC50% value). The ISOBO log ram of all compound combination which shows an IC50% value was plotted. Drawing 15 is the ISOBO log ram of 3TCs by which the association was respectively carried out to AZT, ddC, ddI, Ro 31-8959, and R-82150 (TIBO). When the IC50% value of compound combination exists on Rhine with which the IC50% value of the compound itself [each] was doubled, the two compounds act additively. When combination IC50% exists in the left in Rhine, the compound is acting in multiplication. The dose-response curve about 3TCs combined with AZT, ddC, ddI, Ro 31-8959, and R-82150 (TIBO) is respectively shown by drawing 15. Toxic effectiveness was not observed when the antiviral activity of combination became clear.

[0036] example 3 compound -- the cytotoxicity of independent and combination -- an experiment of these -- setting -- 3TC, and AZT and ddC -- a non-infected peripheral blood liquid lymphocyte and the established T lymphocyte cell lineage compared the cytotoxicity of independent and combination (mg/ml of 1:1, 1:5, and 5:1 ratio). Cytotoxic effect was measured using [3H]-thymidine incorporation assay. The typical dose-

response curve obtained about each compound or 1:1 combination in the PBL cell is respectively shown by drawing 6 and 7.

[Translation done.]

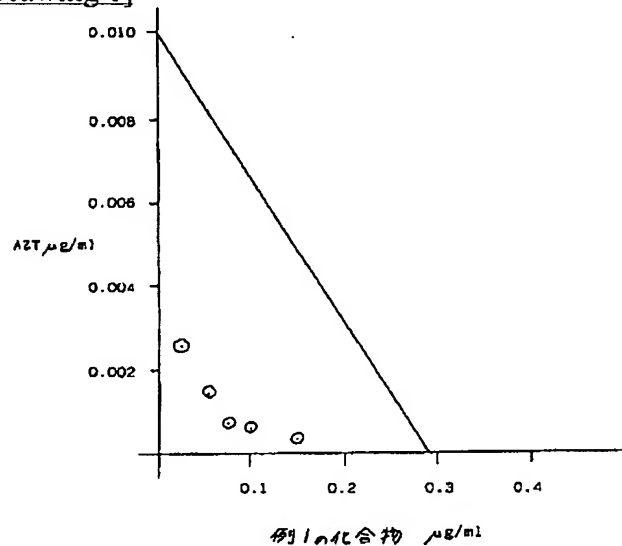
* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

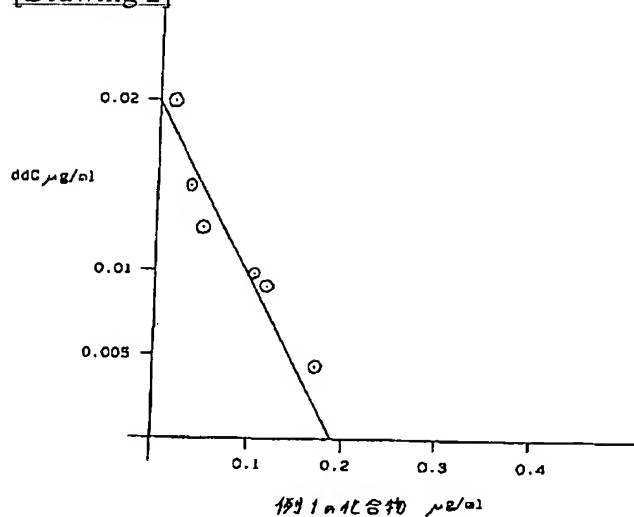
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

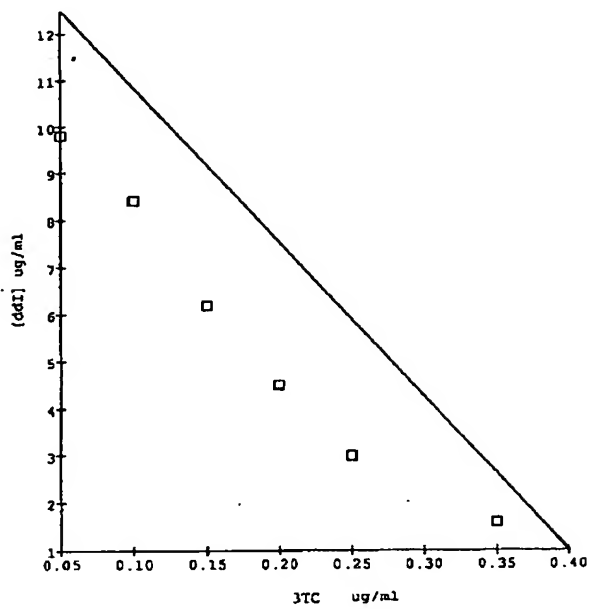
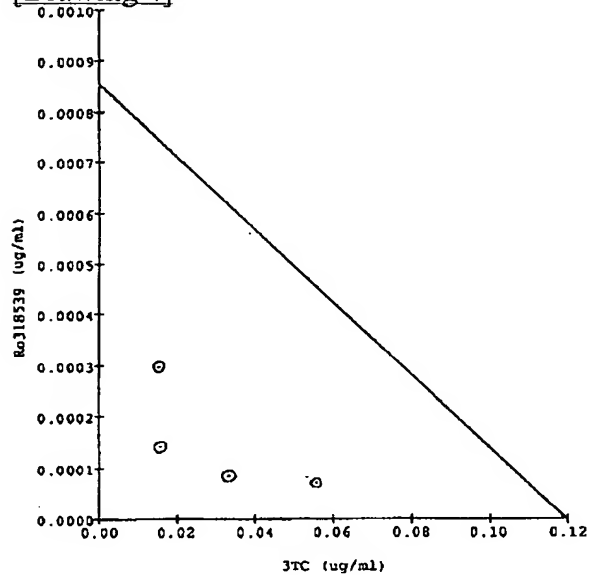
[Drawing 1]



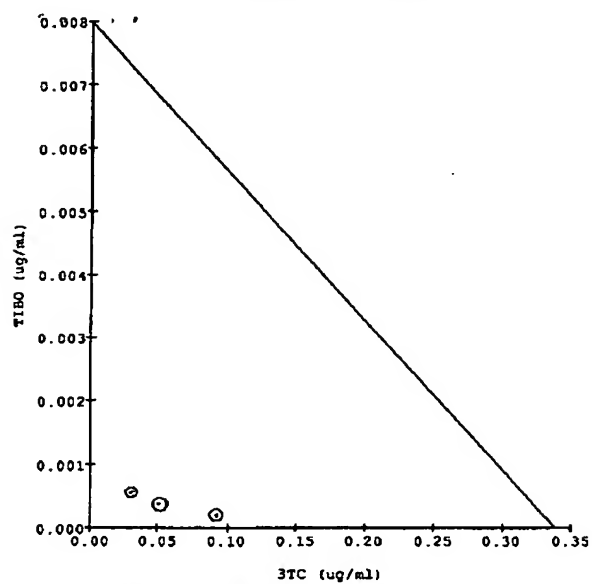
[Drawing 2]



[Drawing 3]

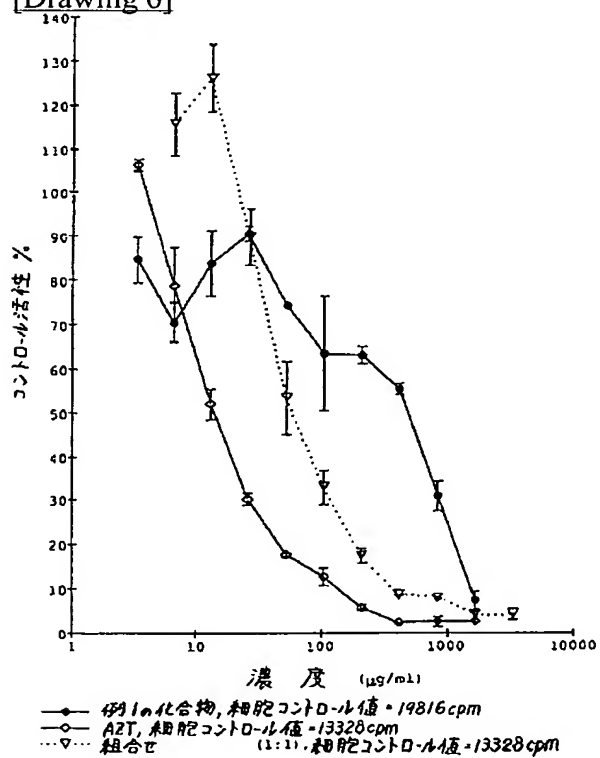
[Drawing 4][Drawing 5]

3TC/TIBO イソログラム

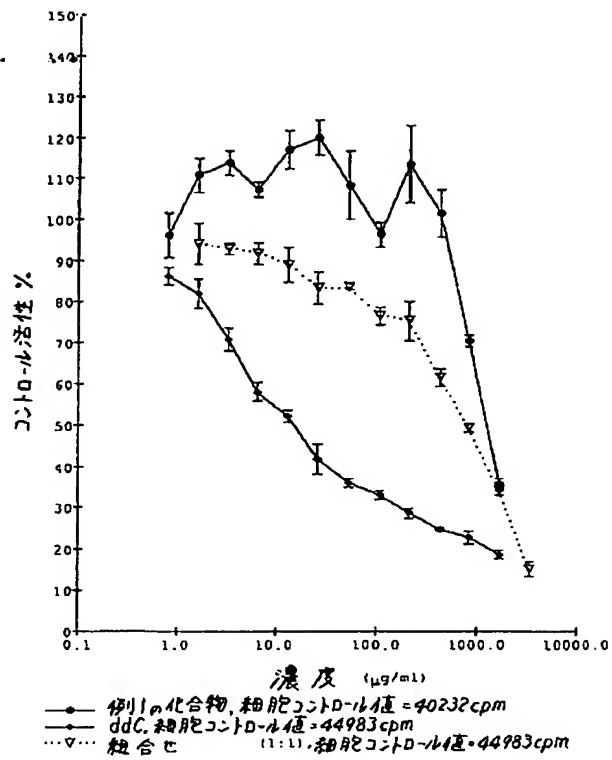


3TC 150% 0.34; TIBO 150% 0.008

[Drawing 6]



[Drawing 7]



[Translation done.]

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-234641

(43)Date of publication of application : 23.08.1994

(51)Int.Cl.

A61K 31/505
A61K 31/47
A61K 31/55
A61K 31/70
// C07D411/04
(A61K 31/505
A61K 31:70)
(A61K 31/505
A61K 31:47)

(21)Application number : 04-148384

(71)Applicant : GLAXO GROUP LTD

(22)Date of filing : 15.05.1992

(72)Inventor : CAMERON JANET M
CAMMACK NICHOLAS

(30)Priority

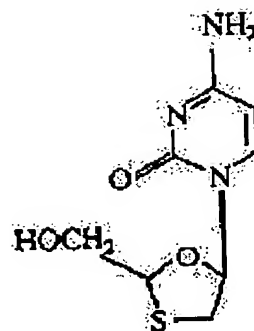
Priority number : 91 9110624	Priority date : 16.05.1991	Priority country : GB
91 9121381	08.10.1991	
91 9123581	06.11.1991	GB
		GB

(54) ANTIVIRAL COMBINATION

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a prescribed agent which consists of a combination of a specific 1,3-oxathiolanenucleoside analogue and another HIV replication inhibitor and has a synergistic viral effect and reduced cytotoxicity.

CONSTITUTION: This prescribed agent consists of a composition contg. a compound represented by the formula or its pharmaceutically-acceptable derivative (preferably, (2R,cis)-4-amino-1-(2-hydroxymethyl-1,3-oxathiolane-5-yl)-1H-pyrimidine-2-one that is a (-) enantiomer, or its salt) and an HIV replication inhibitor (preferably, 3'-azido-3'-deoxythymidine or 2',3'-dioxynosine), together with a pharmaceutically-acceptable carrier for them. The enantiomer of the compound represented by the formula has remarkably lower cytotoxicity as compared with the (+) enantiomer and such a compound consists essentially of the (-) enantiomer and contains substantially no (+) enantiomer (≤ 1 wt.%) is preferably used.



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-234641

(43)公開日 平成6年(1994)8月23日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/505	ADU	7431-4C		
31/47		7431-4C		
31/55		7431-4C		
31/70	A E D	8314-4C		
// C 0 7 D 411/04		7602-4C		

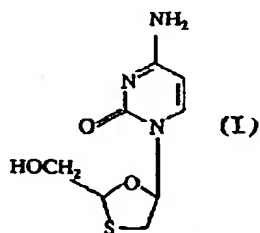
審査請求 未請求 請求項の数13 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-148384	(71)出願人	590003098 グラクソ、グループ、リミテッド イギリス国ミドルセックス、グリーンフォード、パークレー、アベニュー、グラクソ、ハウス(番地なし)
(22)出願日	平成4年(1992)5月15日	(72)発明者	ジャネット、メアリー、カメロン イギリス国グリーンフォード、パークレー、アベニュー(番地なし)グラクソ、グループ、リサーチ、リミテッド内
(31)優先権主張番号	9 1 1 0 6 2 4 . 5	(72)発明者	ニコラス、カマック イギリス国グリーンフォード、パークレー、アベニュー(番地なし)グラクソ、グループ、リサーチ、リミテッド内
(32)優先日	1991年5月16日	(74)代理人	弁理士 佐藤 一雄 (外2名)
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		
(31)優先権主張番号	9 1 2 1 3 8 1 . 9		
(32)優先日	1991年10月8日		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		
(31)優先権主張番号	9 1 2 3 5 8 1 . 2		
(32)優先日	1991年11月6日		
(33)優先権主張国	イギリス(GB)		

(54)【発明の名称】 抗ウイルス組合せ

(57)【要約】 (修正有)

【構成】下記式(I)の化合物:

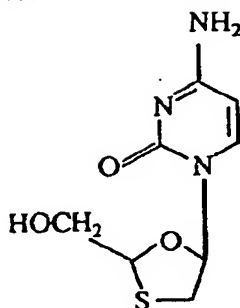


又はその薬学上許容される誘導体及びH I V複製の阻害剤からなる組合せ、その医薬処方剤並びにH I V感染の治療に関するそれらの用途。

【効果】式(I)の化合物は公知のH I V複製阻害剤と組合せて用いられる場合相乗抗ウイルス効果及び／又は細胞毒性の減少を示す。

【特許請求の範囲】

【請求項1】下記式(I)の化合物：



*

*【化1】

(I)

又はその薬学上許容される誘導体及びHIV複製の阻害剤からなる組合せ。

【請求項2】式(I)の化合物が(2R, シス) - 4 - アミノ - 1 - (2 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - オキサチオラン - 5 - イル) - 1H - ピリミジン - 2 - オン (3TC) 又はその薬学上許容される塩である、請求項1に記載の組合せ。

【請求項3】3TCが請求項1に記載された化合物の対応 (+) エナンチオマーを実質上含まない、請求項2に記載の組合せ。

【請求項4】HIV複製の阻害剤がHIV逆転写酵素の阻害剤である、請求項1～3のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項5】阻害剤が3' - アジド - 3' - デオキシチミジン (AZT)、2', 3' - ジデオキシイノシン (ddI)、N' - [1 (S) - ベンジル - 3 - (4a (S), 8a (S), 3 (S) - (tert - ブチルカルバモイル) デカヒドロイソキノリン - 2 - イル) - 2

(R) - ヒドロキシプロピル] - N'' - (キノリン - 2 - イルカルバモイル) - L - アスパラギンアミド (Ro 31 - 8959) 及び (+) - S - 4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 5 - メチル - 6 - (3 - メチル - 2 - ブテニル) イミダゾ [4, 5, 1 - j k] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 2 (1H) - チオン (R - 82913, TIBO) 又はそれらの薬学上許容される誘導体から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項6】(2R, シス) - 4 - アミノ - 1 - (2 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - オキサチオラン - 5 - イル) - 1H - ピリミジン - 2 - オン (3TC) 又はその薬学上許容される誘導体及び3' - アジド - 3' - デオキシチミジン又はその薬学上許容される誘導体からなる組合せ。

【請求項7】式(I)の化合物対HIV複製の阻害剤の比率が重量で250:1～1:250である、請求項1～6のいずれか一項に記載の組合せ。

【請求項8】請求項1で記載された式(I)の化合物又はその薬学上許容される誘導体及びHIV複製の阻害剤をそれらのための薬学上許容されるキャリアと一緒に含む医薬処方剤。

【請求項9】HIV感染にかかった又はかかりやすい、ヒトを除く哺乳動物の治療方法であって、

請求項1で記載された式(I)の化合物又はその薬学上許容される誘導体及びHIV複製の阻害剤を同時投与することからなる方法。

【請求項10】式(I)の化合物及びHIV複製の阻害剤が同時に投与される、請求項9に記載の方法。

【請求項11】式(I)の化合物及びHIV複製の阻害剤が逐次的に投与される、請求項9に記載の方法。

【請求項12】式(I)の化合物が(2R, シス) - 4 - アミノ - 1 - (2 - ヒドロキシメチル - 1, 3 - オキサチオラン - 5 - イル) - 1H - ピリミジン - 2 - オン (3TC) である、請求項9～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】HIV複製の阻害剤が3' - アジド - 3' - デオキシチミジン及び2', 3' - デオキシイノシンから選択される、請求項9～12のいずれか一項に記載の方法。

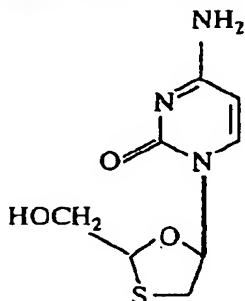
【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は抗ウイルス剤の組合せに関する。更に詳しくは、本発明は1, 3 - オキサチオランヌクレオシドアナログと他の抗ウイルス剤、特にHIVに対して有効な剤との組合せに関する。

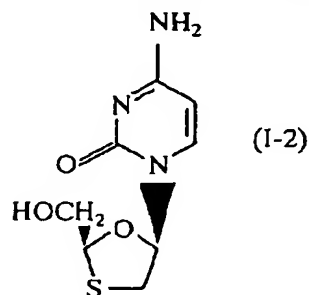
【0002】ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は後天性免疫不全症候群 (AIDS) 及び慢性神経障害を含めた様々な臨床症状を引き起こす。AZT、ddC及びddIのようなヌクレオシドはインビトロでHIV複製を阻害し、細胞によるそれらの5' - 三リン酸誘導体への代謝後にウイルスコード逆転写酵素でそれらの抗ウイルス活性を発揮するらしい。AZTはエイズ患者において罹患率及び死亡率を減少させる。しかしながら、細胞のHIV感染は宿主染色体中にウイルスゲノムを組み込み、このため長期にわたりAZT治療を続けることが必要であった。長期AZT療法の結果として骨髓毒性及びHIV - 1のAZT耐性変異体の出現を伴う。同様に、ddCで治療された一部のエイズ患者は末梢ニューロパシーを生じ、ddIは脾炎及び末梢ニューロパシーを誘導することが示された。

【0003】化合物の組合せ使用は、低毒性で同等の抗

ウイルス効果を生じるか又は化合物間の相乗作用が生じる場合には薬物効力の増加を生じる。全体的薬物用量が低下するほど、HIVの薬物耐性変異体の出現頻度もおそらく減少するであろう。多数の異なる方法が異なるアッセイ系と一緒に作用する化合物の組合せ効果を試験するために用いられた。これら方法のすべては制限を有し、例えば一部の方法はそれらが導かれた場合以外の系に適用された。AZTは組換え可溶性CD4カスチノスベルミン及び組換えインターフェロン α を含めた逆転写以外のHIV-1複製ステップで作用する剤と組合せたときにインビトロで相乗抗ウイルス活性を示す。しかしながら、化合物の組合せは細胞毒性を増加させること*



はBCH-189又はNGPB-21としても知られ、特にエイズの原因体であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対して抗ウイルス活性を有すると記載されていた(5th Anti-Aids Conference, Montreal, Canada 5th-9th June 1989: Abstracts T.C.O.1 and M.C.P.63; 欧州特許※



【0006】式(I)の化合物のエナンチオマーはHIVに対して等効力であるが、一方のエナンチオマー(−)エナンチオマーは(+)エナンチオマーよりも著しく低い細胞毒性を有する。その(−)エナンチオマーは(−)シス-4-アミノ-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-オキサチオラン-5-イル)-1H-ピリミジン-2-オンという化学名を有する。それは(2R,シス)-4-アミノ-1-(2-ヒドロキシメチル-1,3-オキサチオラン-5-イル)-1H-ピリミジン-2-オンという名称を有した式(I-1)の化合物の絶対立体化学を有する。この化合物は現在3TCとして知られる。

【0007】我々は式(I)の化合物、特にその(−)エナンチオマーがHIV複製の公知阻害剤と組合せて用いられた場合に予想外の利点を示すことをここに発見し

*に注意しなければならない。AZT及び組換えインターフェロン α は正常ヒト骨髓始原細胞で高い細胞毒性効果を有する。

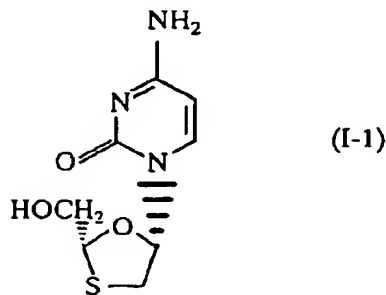
【0004】AZTと他のヌクレオシドとの組合せも研究された。ddCは高用量AZTの骨髓細胞毒性をその抗ウイルス活性に影響せずに除く。ddI及びAZTは組合せてやや高い選択性を示し、相乗抗ウイルス効果が正常ヒト骨髓始原細胞に対して相加毒性以上に作用している。

10 【0005】下記式(I)の化合物:
【化2】

(I)

※出願公開第382562号明細書)。式(I)の化合物は下記式(I-1)及び(I-2)の2種エナンチオマーのラセミ混合物である:

【化3】



(I-1)

た。特に式(I)の化合物は、HIV複製の公知阻害剤と組合せて用いられた場合に、相乗抗ウイルス効果及び/又は細胞毒性の減少を示す。

40 【0008】このため本発明の第一面において、式(I)の化合物又はその薬学上許容される誘導体及びHIV複製の阻害剤からなる組合せが提供される。阻害剤はそのHIV複製阻害方法にかかわらずいかなるHIV複製阻害剤であってもよい。このような阻害剤としては、例えばHIV逆転写酵素、HIVプロテアーゼ及びTAT等を阻害するものがある。このような阻害剤としては、例えば3'-アジド-3'-デオキシシチジン(AZT, ジドブジン)、2',3'-ジデオキシシチジン(ddC)、2',3'-ジデオキシイノシン(ddI)、N'-[1(S)-ベンジル-3-[4a(S),8a(S),3(S)-(tert-ブチルカルバモイル)デカ

ヒドロイソキノリン-2-イル]-2(R)-ヒドロキシプロピル]-N-(キノリン-2-イルカルバモイル)-L-アスパラギンアミド(Ro31-8959)及び(+)-S-4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-5-メチル-6-(3-メチル-2-ブテニル)イミダゾ[4, 5, 1-jk][1, 4]ベンゾジアゼピン-2(1H)-チオン(R-82150, TIBO)又はこれらの薬学上許容される誘導体がある。

【0009】好ましくは、式(I)の化合物はその(-)エナンチオマー(3TC)の形である。好ましくは、HIV複製の阻害剤はAZT, ddI, Ro31-8959又はR-82150(TIBO)から選択される。ddI又は特にAZTがHIV複製の阻害剤として特に好ましい。式(I)の化合物が(-)エナンチオマーの形である場合、それは通常対応(+)-エナンチオマーを実質上含まずに提供され、即ち約5%w/w以下、好ましくは約2%w/w以下、特に約1%w/w以下の(+)-エナンチ*

o

がアシル官能基R-C-[そのエステル(non-carbonyl)部分Rは水素、直鎖又は

分岐鎖アルキル(例えばメチル、エチル、n-プロピル、t-ブチル、n-ブチル)、アルコキシアルキル(例えばメトキシメチル)、アラルキル(例えばベンジル)、アリーロキシアルキル(例えばフェノキシメチル)、アリール(例えばハロゲン、C₁₋₄アルキル又はC₁₋₄アルコキシで場合により置換されたフェニル)から選択される]により置換された化合物;アルキル-又はアラルキルスルホニル(例えばメタンスルホニル)のようなスルホン酸エステル;アミノ酸エステル(例えばL-バリル又はL-イソロイシル)及び一、二又は三リン酸エステルがある。上記エステルに関して他に指摘のないかぎり、存在するいかなるアルキル部分も有利には炭素原子1~16、特に炭素原子1~4を有する。このようなエステルに存在するいかなるアリール部分もフェニル基を有することが有利である。特に、エステルはC₁₋₁₆アルキルエステル、非置換ベンジルエステル又は少なくとも1つのハロゲン(臭素、塩素、フッ素又はヨウ素)、C₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、ニトロもしくはトリフルオロメチル基で置換されたベンジルエステルである。

【0012】式(I)の化合物の薬学上許容される塩としては薬学上許容される無機及び有機酸及び塩基から誘導される塩がある。適切な酸の例としては塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸及びベンゼンスルホン酸がある。シュウ酸のような他の酸はそれ自体薬学上許容されるものでないが、本発明の化合物及びそれらの薬学上許容され

*オマーが存在するだけである。

【0010】“薬学上許容される誘導体”とは、親化合物のあらゆる薬学上許容される塩、エステル又はこのようなエステルの塩あるいは受容体への投与で親化合物又は抗ウイルス上活性な代謝産物もしくは残基を(直接的又は間接的に)形成することができるあらゆる他の化合物を意味する。式(I)の化合物が塩基部分及びオキサチオラン環のヒドロキシメチル基の双方における官能基でその薬学上許容される誘導体を形成するように変えてよいことは当業者にとり明らかであろう。すべてのこのような官能基における修正が本発明の範囲内に含まれる。しかしながら、オキサチオラン環の2-ヒドロキシメチル基の修正で得られた薬学上許容される誘導体が特に興味ある。

【0011】式(I)の化合物の好ましいエステルとしては、2-ヒドロキシメチル基の水素

を酸付加塩を得る上で中間体として有用である。適切な塩基から誘導される塩としてはアルカリ金属(例えばナトリウム)、アルカリ土類金属(例えばマグネシウム)、アンモニウム及びNR₄⁺(RはC₁₋₄アルキルである)塩がある。

【0013】式(I)の化合物は組合せの第二成分と相乗的であり及び/又は第二成分の細胞毒性効果を除く。式(I)の化合物及び第二抗ウイルス剤の有利な効果は、例えば1:250~250:1、好ましくは1:50~50:1、特に約1:10~10:1の広い比率にわたり実現される。好都合には、各化合物はそれが単独で用いられた場合に抗ウイルス活性を示す量で組合せて用いられる。

【0014】本組合せはヒトにおけるウイルス感染又はウイルス関連腫瘍に対して通常有用であると予想され、インビトロ又はインビボでウイルス感染又は腫瘍増殖を阻害するためのそれらの用法も本発明の範囲内に属する。このため第二面において、式(I)の抗ウイルス化合物及びHIV複製の阻害剤の同時投与からなるヒトを含めた哺乳動物におけるウイルス感染の治療方法が提供される。一糖又は多数の対合組合せのいずれかにおける式(I)の化合物及び2種以上の第二抗ウイルス剤の組合せ投与からなる治療方法も本発明の範囲内に属する。式(I)の化合物及び第二抗ウイルス剤が同時、逐次的又は組合せのいずれかで投与してもよいことは明らかであろう。投与が逐次的である場合、第二活性成分を投与する時間的遅れは組合せの相乗効果の利益を失うようなものであってはならない。好ましくは、投与は同時である。ここで治療に言及するときは確立された感染又は症状の治療のみならず予防にも及ぶことは当業者にとり明らか

であろう。

【0015】治療用に必要な本発明の組合せ量は選択される具体的化合物のみならず投与経路、治療される症状の性質、患者の年齢及び症状に応じて変わり、最終的には担当医又は獣医の裁量に委ねられることも更に明らかであろう。しかしながら一般に、適切な用量は組合せ剤の各活性成分に関して約1～約750mg/kgの範囲、例えば3～約120mg/kg 受容体体重/日のような約10～約75mg/kg 体重/日、好ましくは6～90mg/kg/日の範囲、最も好ましくは15～60mg/kg/日の範囲である。望ましい用量は単一用量で又は例えば2、3、4又はそれ以上の準用量/日のような適切な間隔で投与される分割された用量で与えられることが都合よい。組合せ剤は、例えば単位剤形当たり各々の活性成分10～1500mg、好都合には20～1000mg、最も好都合には50～700mgを含有した単位剤形で投与されることが都合よい。理想的には、組合せ剤は各々の活性化化合物約1～約75mM、好ましくは約2～50mM、最も好ましくは約3～約30mMのピーク血漿濃度に達するように投与されるべきである。これは例えば場合により塩水中で活性成分の0.1～5%溶液の静脈内注射により達成されるか又は各々の活性成分約1～約100mgを含有したボーラスとして経口投与される。望ましい血液レベルは各々の活性成分約0.01～約5.0mg/kg/hrを与える持続注入により又は約0.4～約15mg/kgを含有した断続注入により維持される。

【0016】治療用に組合せ剤の活性成分は化合物そのままとして投与されることが可能であるが、医薬処方剤として組合せ剤を提供することが好ましい。このため、本発明は式(I)の化合物又はその薬学上許容される誘導体及びHIV複製の阻害剤を1種以上のそれらのための薬学上許容されるキャリア及び場合により他の治療及び/又は予防成分と一緒に含む医薬処方剤を更に提供する。キャリアは処方他の成分と適合しかつその受容体に有害でないという意味で“許容しうる”ものでなければならない。医薬処方剤としては経口、経直腸、経鼻、局所（経口腔及び舌下を含む）、経膈もしくは非経口（筋肉内、皮下及び静脈内を含む）投与に適した形又は吸入もしくは通気による投与に適した形がある。処方剤は適切であれば別個の投薬単位で提供されることが都合よく、調剤業界で周知のいかなる方法で製造してもよい。すべての方法では活性化化合物を液体キャリア、微粉碎固体キャリア又は双方と混ぜ、しかる後必要であれば製品を望ましい処方に成形するステップを含む。

【0017】経口投与に適した医薬処方剤は各々が規定量の活性成分を含有したカプセル、カシエ剤又は錠剤のような別個の単位として；粉末又は顆粒として；溶液、懸濁液又は乳濁液として提供されることが都合よい。活性成分はボーラス、舐剤又はペーストとして提供してもよい。経口投与用の錠剤及びカプセルは結合剤、フィラ

一、滑沢剤、崩壊剤又は保湿剤のような慣用的賦形剤も含有してよい。錠剤は当業界で周知の方法に従いコートしてもよい。経口液体製剤は例えば水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳濁液、シロップ又はエリキシルの形であってもあるいは使用前に水又は他の適切なビヒクルで調製される乾燥製剤として提供してもよい。このような液体製剤は懸濁化剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油も含む）又は保存剤のような慣用的添加剤を含有していてもよい。

10 【0018】本発明による化合物は非経口投与（例えば、ボーラス注射又は持続注入のような注射による）用に処方してもよく、保存剤が添加されたアンプル、前充填シリンジ、少容量注入又は多容量容器中において単位用量形で提供してもよい。組成物は油性又は水性ビヒクル中で懸濁液、溶液又は乳濁液のような形をとって、懸濁剤、安定剤及び/又は分散剤のような処方剤も含有してよい。一方、活性成分は使用前に適切なビヒクル、例えば無菌無発熱物質水で調製するために滅菌固体物の無菌的単離又は溶液からの凍結乾燥により得られた粉末形

20 【0019】表皮への局所投与の場合、本発明による化合物は軟膏、クリームもしくはローションとして又は経皮パッチとして処方してよい。軟膏及びクリームは、例えば適切な増粘剤及び/又はゲル化剤の添加で水性又は油性基剤と共に処方される。ローションは水性又は油性基剤で処方され、一般に1種以上の乳化剤、安定剤、分散剤、懸濁化剤、増粘剤又は着色剤も含有する。

30 【0020】口内局所投与用に適した処方剤としては、通常スクロース及びアラビアガム又はトラガカントガムのような芳香基剤中に活性成分を含むロゼンジ；ゼラチン及びグリセリン又はスクロース及びアラビアガムのような不活性基剤中に活性成分を含むバステル；適切な液体キャリア中に活性成分を含む洗口液がある。キャリアが固体である経直腸投与用に適した医薬処方剤は、最も好ましくは単位用量坐剤として提供される。適切なキャリアとしてはカカオ脂及び当業界で常用される他の物質があり、坐剤は活性化化合物と軟化又は溶融キャリアとの混和しかる後型内で冷却及び成形により形成されることが都合よい。

40 【0021】膈投与用に適した処方剤は、活性成分に加えて適切として当業界で公知のようなキャリアを含有したベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレーとして提供してよい。

【0022】鼻内投与の場合、本発明の化合物は液体スプレーもしくは飛散性粉末として又は滴剤の形で用いてよい。滴剤は更に1種の分散剤、可溶化剤又は懸濁化剤も含めて水性又は非水性基剤で処方される。液体スプレーは加圧バックから放出されることが都合よい。

50 【0023】吸入による投与の場合、本発明による化合物は通気器、ネブライザー、加圧バック又はエアゾール

スプレーを放出する他の慣用的手段から放出されることが都合よい。加圧バックはジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の適切なガスのような適切な噴射剤を含む。加圧エアゾールの場合、投薬単位は計測量を放出するバルブを備えることで決定される。一方、吸入又は通気による投与の場合、本発明による化合物は乾燥粉末組成物、例えば本化合物とラクトース又はデンプンのような適切な粉末基剤との粉末ミックスの形をとってもよい。粉末組成物は例えばゼラチンのようなカプセルもしくはカートリッジ又は粉末が吸入器もしくは通気器の助けで投与されるブリスターバックの単位剤形で提供してもよい。

【0024】所望であれば、活性成分を徐放性にするように適合された前記処方剤が用いられる。本発明による医薬組成物は抗菌剤のような他の活性成分又は保存剤も含有してよい。式(I)の化合物は欧州特許出願公開第382562号明細書で記載されたように得られる。その個々のエナンチオマーはそれらの構成エナンチオマーへのラセミ体の分離に関して当業界で公知のいずれかの方法による分割でそのラセミ体から得られる。特に、それらはキラルHPLC、シチジンデアミナーゼのような適切な酵素による酵素媒介エナンチオマー選択性異化作用又は5'-ヌクレオチドを用いた適切な誘導体の選択的酵素分解により公知のラセミ体から得られる。3TCの製造方法は国際特許出願公開WO第91/17159号明細書で記載されている。

【0025】下記例は本発明について示すが、但しその制限としては解釈されない。

中間体1

5-メトキシ-1,3-オキサチオラン-2-メタノール安息香酸エステル

熱メタノール(15ml)中塩化亜鉛(1.6g)の溶液をトルエン(1300ml)中メルカプトアセトアルデヒドジメチルアセタール(34.2g)及びベンゾイルオキシアセトアルデヒド(48.3g)の攪拌溶液に加え、しかる後窒素下で50分間加熱還流した。冷却された混合液を濃縮し、わずかなトルエンで希釈し、しかる後多孔質珪藻土で濾過した。合わせた濾液及びトルエンを水性飽和炭酸水素ナトリウム溶液(×2)及び塩水で洗浄し、(MgSO₄)乾燥し、しかる後油状物まで蒸発させ、これをシリカ(2kg、メルク9385)上カラムクロマトグラフィーに付してクロロホルムで溶出させ、油状物でアノマーの混合物(約1:1)として標題生成物(45.1g)を得た; ¹H NMR (DMSO-d₆) 3.1-3.3(4H), 3.42(6H), 4.4-4.6(4H), 5.41(1H), 5.46(1H), 5.54(1H), 5.63(1H), 7.46(4H), 7.58(2H), 8.07(4H); γ_{max}(CHBr₃) 1717.6cm⁻¹

【0026】中間体2

(±)-シス-1-(2-ベンゾイルオキシメチル-

1,3-オキサチオラン-5-イル)-(1H)-ピリミジン-2,4-ジオン

微粉碎ウラシル(9.62g)、ヘキサメチルジシラザン(50ml)及び硫酸アンモニウム(30mg)の混合液を透明な溶液が得られるまで窒素下で加熱還流した。これを冷却し、しかる後無色油状物まで蒸発させ、これを窒素雰囲気下でアセトニトリル(100ml)に溶解した。溶液をアセトニトリル(600ml)中5-メトキシ-1,3-オキサチオラン-2-メタノール安息香酸エステル(中間体1)(19.43g)の攪拌水冷溶液に加え、トリメチルシリルトフルオロメタンスルホネート(14.7ml)を加えた。氷浴を取除き、溶液を窒素下で45分間加熱還流した。冷却及び蒸発後、残渣を1kgのシリカゲル(メルク9385)上カラムクロマトグラフィーによりクロロホルム/メタノール9:1で溶出させて精製した。適切な分画を冷却し、蒸発させて、粗製残渣を得た。これを最少の熱メタノール(約1200ml)から分別結晶化し、白色結晶として標題化合物(6.32g)を得た; ¹H NMR (DMSO-d₆) 11.36(1H,bs), 7.50-8.00(6H,m), 6.20(1H,t), 5.46(2H,m), 4.62(2H,m), 3.48(1H,m), 3.25(1H,m).

【0027】中間体3

(±)-シス-4-アミノ-1-(2-ベンゾイルオキシメチル-1,3-オキサチオラン-5-イル)-(1H)-ピリミジン-2-オン

方法(a)

ヘキサメチルジシラザン(110ml)中シトシン(20.705g)及び硫酸アンモニウム(数mg)の懸濁液を窒素下で2.5時間にわたり攪拌かつ加熱還流した。溶媒を蒸発により除去し、残留固体物を乾燥アセトニトリル(350ml)に溶解した。この溶液を窒素下でアセトニトリル(650ml)中5-メトキシ-1,3-オキサチオラン-2-メタノール安息香酸エステル(中間体1)(43.57g)の攪拌水冷溶液に軟質針技術で移した。トリメチルシリルトフルオロメタンスルホネート(33ml)を加え、溶液を環境温度まで加温し(1.5時間)、しかる後一夜加熱還流した。残留混合物を濃縮し、飽和水性炭酸水素ナトリウム溶液(500ml)で希釈し、しかる後酢酸エチル(3×500ml)で抽出した。合わせた抽出液を水(2×250ml)及び塩水(250ml)で洗浄し、(MgSO₄)乾燥し、しかる後油状物まで蒸発させ、これをシリカ(600g、メルク7734)上カラムクロマトグラフィーに付して酢酸エチル-メタノール混合液で溶出させ、アノマーの混合物(約1:1, 31.59g)を得た。混合物を水(45ml)及びエタノール(9.0ml)から結晶化させて固体物(10.23g)を得、これをエタノール(120ml)及び水(30ml)から再結晶化し、白色固体物として標題生成物(9.26g)を得た; λ_{max}(MeOH) 229.4nm(E_{1cm}^{1%} 610); 272.4nm(E_{1cm}^{1%} 293); ¹H

NMR (DMSO- d_6) 3.14(1H), 3.50(1H), 4.07(2H), 5.52(1H), 5.66(1H), 6.28(1H), 7.22(2H), 7.56(2H), 7.72(2H), 8.10(2H).

【0028】方法(b)

オキシ塩化リン(7.0ml)をアセトニトリル(120ml)中1, 2, 4-トリアゾール(11.65g)の攪拌氷冷懸濁液に滴下し、しかる後内部温度を15℃以下に保ち、トリエチルアミン(22.7ml)を滴下した。10分間後アセトニトリル(330ml)中(±)-シス-1-(2-ベンゾイルオキシメチル-1, 3-オキサチオラン-5-イル)-(1H)-ピリミジン-2, 4-ジオン(中間体2)(6.27g)の溶液をゆっくりと加えた。次いで攪拌を室温で一夜続けた。混合液を氷浴で冷却し、トリエチルアミン(30ml)しかる後水(21ml)をゆっくりと加えた。得られた溶液を蒸発させ、残渣を飽和炭酸水素ナトリウム溶液(400ml)及びクロロホルム(3×200ml)に分配した。合わせたクロロホルム抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過し、蒸発させて、粗製残渣(9.7g)を得た。残渣を1, 4-ジオキサン(240ml)に溶解し、濃水性アンモニア溶液(比重0.880, 50ml)を加えた。1.5時間後に溶液を蒸発させ、残渣をメタノールに溶解させた。これは固体物を沈澱させたが、これを濾去した。母液をシリカゲル(メルク9385, 600g)上カラムクロマトグラフィーにより精製した。適切な分画をブールし、蒸発させ、方法(a)で得られた場合と同一の標題化合物を淡黄褐色固体物(2.18g)を得た。

【0029】中間体4

(±)-シス-4-アミノ-1-(2-ヒドロキシメチル-1, 3-オキサチオラン-5-イル)-(1H)-ピリミジン-2-オン
メタノール(250ml)中(シス)-4-アミノ-1-(2-ベンゾイルオキシメチル-1, 3-オキサチオラン-5-イル)-(1H)-ピリミジン-2-オン(中間体3)(8.19g)及びアンバーライト(Amberlite)IRA-400(OH)樹脂(8.24g)の懸濁液を1.25時間にわたり攪拌かつ加熱還流した。固体物を濾去し、しかる後メタノールで洗浄した。合わせた濾液を蒸発させた。残渣を酢酸エチル(80ml)で摩擦した。得られた白色固体物を濾取し、標題生成物(5.09g)を得た; ^1H NMR (DMSO- d_6) 3.04(1H), 3.40(1H), 3.73(2H), 5.18(1H), 5.29(1H), 5.73(1H), 6.21(1H), 7.19(2H), 7.81(1H).

【0030】例1

(一)-シス-4-アミノ-1-(2-ヒドロキシメチル-1, 3-オキサチオラン-5-イル)-(1H)-ピリミジン-2-オン

(i) 栄養プロス【オキソイド社(Oxoid Ltd)】の3つの50mlフラスコを栄養寒天プレートから掻き取られた各々の大腸菌(ATCC23848)で環状に接種し

た。フラスコを250回転/minで振盪しながら37℃で一夜インキュベートし、しかる後各フラスコを用いて7L醗酵槽中のCDD培地[3g/l グルタミン酸; 0.2g/l MgSO_4 ; 2.5g/l K_2SO_4 ; 2.3g/l NaCl ; 1.1g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.6g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1.2g/l シチジン]4Lに接種した。培養物を4L/minで通気下37℃で750回転/minで醗酵させた。24時間増殖後に細胞を遠心(5000g, 30分間)で集め、湿重量72gを得た。細胞ペレットを20mMトリスHCl緩衝液(pH 7.5)300mlに再懸濁し、超音波(4×45秒間)で破壊した。細胞碎片を遠心(30,000g, 30分間)により除去し、上澄中のタンパク質を75%飽和まで硫酸アンモニウムの添加で沈降させた。沈降物を遠心(30,000g, 30分間)で集め、ペレットを硫酸アンモニウム(75%飽和)含有HEPES緩衝液(100mM pH7.0)25mlに再懸濁した。酵素溶液を12,000rpmで30分間の遠心により得た。上澄を捨て、ペレットを原容量までトリスHCl緩衝液(pH 7.0, 100mM)に溶解した。

【0031】(ii) 中間体4(115mg)を水(100ml)に溶解し、攪拌した。酵素溶液(0.5ml)を加え、混合液をHCl(25mM)の継続的添加により一定pHで維持した。変換はキラルHPLCによりモニターし、(+)エナンチオマーの基質が優先的に脱アミノ化されたことを示した。22時間後に(+)エナンチオマーの基質(RT12.5min)が完全に除去され、溶液を濃水酸化ナトリウムの添加でpH10.5に調整した。上記で得られた溶液をpH11に前平衡化されたQAEセファデックスのカラム[A25; ファルマシア(Pharmacia); 30X1.6cm]で溶出させた。カラムを水(200ml)しかる後HCl(0.1M)で洗浄した。分画(40ml)を取出し、逆相HPLCで分析した。未反応(-)エナンチオマーの基質含有の分画5-13を合わせ、HClでpH7.5に調整した。脱アミノ化生成物含有の分画47を希NaOHでpH7.5に調整した。キラルHPLCによる分析では、この物質が主成分として一方のエナンチオマー(RT10.2min)及び副成分として他方のエナンチオマー(RT8.5min)からなる混合物(e.e.約90%)であることを示した。

【0032】(iii)前記段階(ii)を大規模で繰り返した。水250ml中例1の化合物(363mg)を段階(i)の場合のように調製された酵素溶液(0.5ml)と共にインキュベートした。更に一部(0.5ml)の酵素を18及び47時間後に追加した。反応混合液を70時間攪拌し、しかる後更に64時間放置した。キラルHPLCによる分析では(+)エナンチオマーの基質が完全に脱アミノ化されたことを示したため、得られた溶液をNaOHでpH10.5に調整した。上記溶液を同QAEカラムにのせ、段階(i)の場合のように溶出させ

た。残留基質及び脱アミノ化生成物の混合物を含有した分画2・6を合わせた。残留基質（(-) エナンチオマー）含有分画7・13を合わせ、pH7.5に調整した。脱アミノ化生成物含有分画25・26を合わせ、中和した。上記分画2・6を同QAEカラムで再溶出させた。この第二カラムからの分画3・11は未反応基質（(-) エナンチオマー）を含有していた。分画70は脱アミノ化生成物を含有していた。

(iv) 段階(ii)及び(iii)からの分割された基質分画を合わせ、pH7.5に調整した。この溶液を水で充填されたXAD-16のカラム(40×2.4cm)で溶出させた。カラムを水洗し、しかる後アセトン：水(1:4v/v)で溶出させた。望ましい(-) エナンチオマー含有の分画を合わせて凍結乾燥し、白色粉末(190mg)を得た。

【0033】上記で用いたHPLC法は下記のとおりであった：

1. 逆相分析HPLC

カラム：キャピタルカートリッジ(Capital Cartridge) スフェリソルブ(Spherisorb)ODS-2(5μM) 150×4.6mm

溶出液：リン酸二水素アンモニウム(50mM)+5%MeCN

流速：1.5ml/min

検出：UV270nm

保持時間：BCH189 5.5min

：脱アミノ化BCH189 8.1min

2. キラル分析HPLC

カラム：シクロボンドIアセチル(Cyclobond I Acetyl) 250×4.6mm

溶出液：0.2%酢酸トリエチルアンモニウム(pH7.2)

流速：1.0ml/min

検出：UV270nm

保持時間：BCH189 11.0及び12.5min

：脱アミノ化BCH189 8.5及び10.2min

(生体変換は12.5minでピークの喪失及び10.2minで生成物の蓄積をモニターすることにより追跡した)

【0034】例2

3. 1単独又は組合せの抗ウイルス活性

化合物を最初に96ウェル微量滴定プレートにおいて2倍ずつ連続希釈した。チェッカーボード滴定は各化合物希釈液から25ml部分を単独又は組合せ双方で(新しい96ウェル微量滴定プレート中で最終容量50mlに)ミックスすることにより調製した。RPMI1640増殖培地中で一部のMT-4細胞(10⁶細胞/ml)を2×10⁻³感染用量/細胞でHIV-1株RFにより感染させた。ウイルスを室温で90分間吸着させた後、細胞をRPMI1640増殖培地中で洗浄して未吸着ウイルス

を除去し、RPMI1640増殖培地に10⁶細胞/mlで再懸濁した。感染細胞懸濁液50mlを化合物又は増殖培地のみ含有のウェルに接種した。擬感染細胞懸濁液50mlを非化合物含有ウェルに接種した。次いでプレートを5%CO₂/空气中37℃で7日間インキュベートした。インキュベート後、7.5mg/mlの3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド(MTT)10mlをすべてのウェルに加え、プレートを37℃で更に90分間インキュベートした。次いでイソプロパノール中10%(v/v)トリトンX-100150mlを加え、細胞を再懸濁させた。15分間後に室温でプレートをマルチスキャンMC(Multiskan MC)〔フローラボラトリーズ(Flow Laboratories),アービン,UK〕リーダーにおいて405nmで分析した。黄色MTTからそのホルマザン誘導体への変換は未感染未処理細胞で最大であり、未処理感染細胞では存在しない。

【0035】用量-応答曲線を各化合物単独(IC50%値)に関して及び第二化合物の固定濃度下で各化合物の逆滴定に関してプロットした。IC50%値を示すすべての化合物組合せのイソボログラムをプロットした。図1-5はAZT、ddC、ddI、Ro31-8959及びR-82150(TIBO)と各々組合せられた3TCのイソボログラムである。化合物組合せのIC50%値が各化合物自体のIC50%値を合わせたライン上に存在する場合、その2化合物は相加的に作用する。組合せIC50%がラインの左に存在する場合、その化合物は相乗的に作用している。AZT、ddC、ddI、Ro31-8959及びR-82150(TIBO)と組合せられた3TCに関する用量-応答曲線は各々図1-5で示されている。毒性効果は組合せの抗ウイルス活性が判明した場合に観察されなかった。

【0036】例3

化合物単独及び組合せの細胞毒性

これらの実験において、3TC、AZT及びddC単独及び組合せ(1:1、1:5及び5:1のmg/ml比)の細胞毒性を未感染末梢血液リンパ球及び確立されたTリンパ球細胞系で比較した。細胞毒性は〔³H〕-チミジン取込みアッセイを用いて測定した。PBL細胞において各化合物又は1:1組合せに関して得られた典型的な用量-応答曲線は各々図6及び7で示されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】AZTと組合わされた3TCのイソボログラムを示している。

【図2】ddCと組合わされた3TCのイソボログラムを示している。

【図3】ddIと組合わされた3TCのイソボログラムを示している。

【図4】Ro31-8959と組合わされた3TCのイソボログラムを示している。

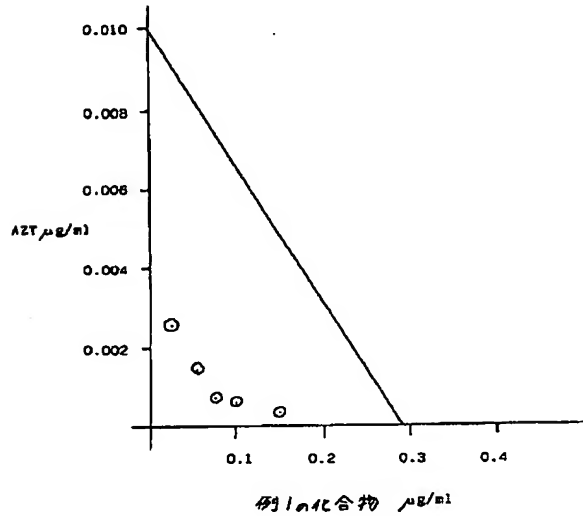
【図5】R-82150 (TIBO) と組合わされた3TCのイソログラムを示している。

【図6】PBL細胞において各化合物又は1:1組合せに関して得られた典型的な用量・応答曲線について示し*

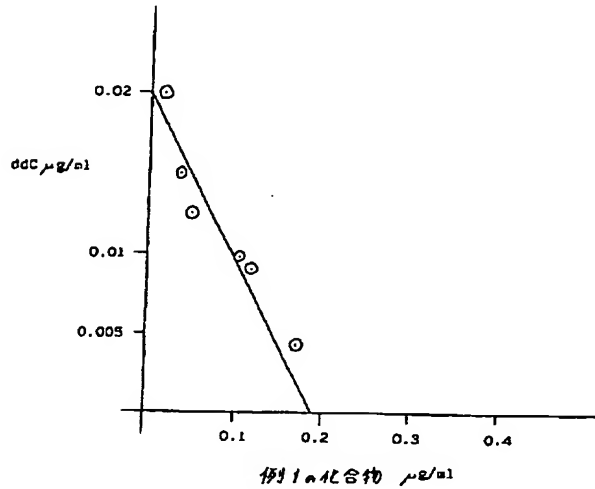
＊ている。

【図7】PBL細胞において各化合物又は1:1組合せに関して得られた典型的な用量・応答曲線について示している。

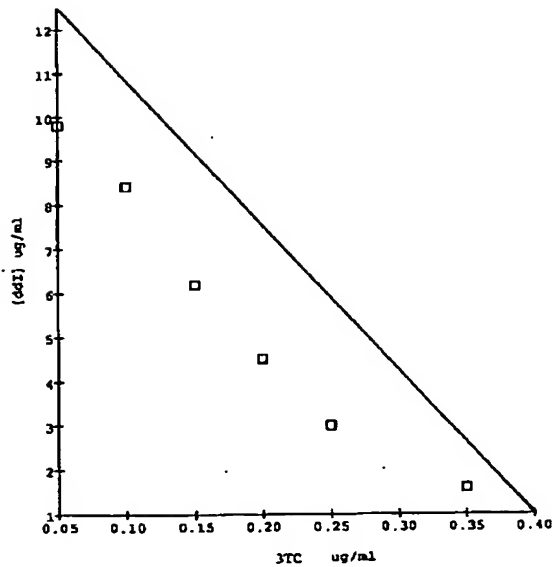
【図1】



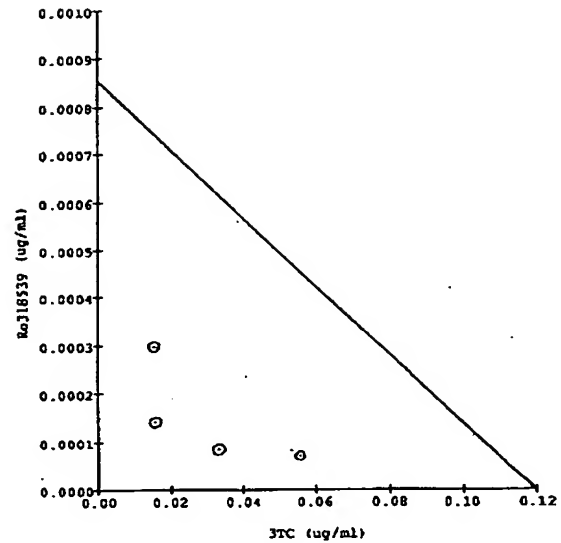
【図2】



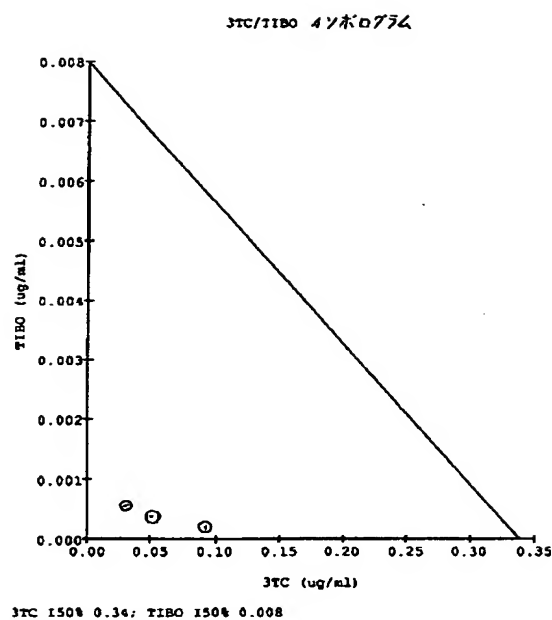
【図3】



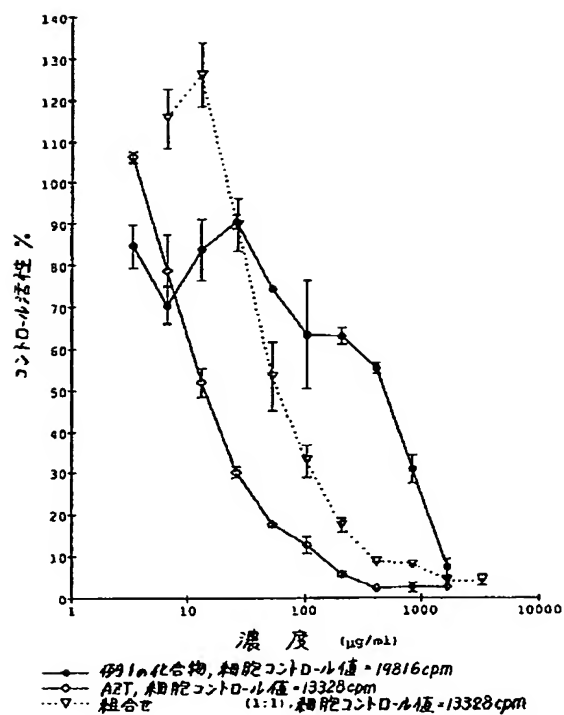
【図4】



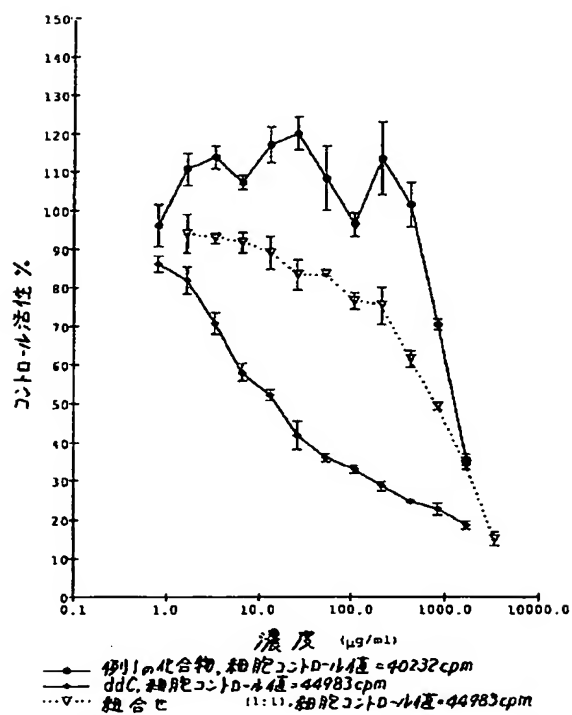
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
(A 6 1 K 31/505 31:70)				
(A 6 1 K 31/505 31:47)		7431-4C		